

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PCT

**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE**  
**Bureau international**

**DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)**

(51) Classification internationale des brevets<sup>5</sup>: WO 94/26764  
C07H 21/00 A1 (11) Numéro de publication internationale:  
(43) Date de publication internationale: 24 novembre 1994 (24.11.94)

(21) Numéro de la demande internationale:	PCT/FR94/00563	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international:	11 mai 1994 (11.05.94)	
(30) Données relatives à la priorité:	93/05706                    12 mai 1993 (12.05.93)	FR
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ):	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR).	
(72) Inventeurs; et		
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ):	IMBACH, Jean-Louis [FR/FR]; Impasse des Luques, Rue de Las Sorbes, F-34000 Montpellier (FR). RAYNER, Bernard [FR/FR]; Chênes Colombière, G 68, 180, avenue d'Occitanie, F-34100 Montpellier (FR).	
(74) Mandataire:	WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, Avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	

(54) Title: TRIESTER PHOSPHOROTHIOATE OLIGONUCLEOTIDES AND METHOD OF PREPARATION

(54) Titre: OLIGONUCLÉOTIDES PHOSPHOROTHIOATES TRIESTERS ET PROCÉDÉ DE PRÉPARATION

### (57) Abstract

The triester phosphorothioate oligonucleotides disclosed comprise internucleotide concatenations having a P-S' bond protected by a bioreversible grouping (X) in intracellular media.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet des oligonucléotides phosphorothioates triesters caractérisés en ce qu'ils comportent des enchaînements internucléotidiques qui présentent une liaison P-S' protégée par un groupement (X) bioréversible dans les milieux intracellulaires.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
RJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Malta	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## OLIGONUCLEOTIDES PHOSPHOROTHIOATES TRIESTERS ET PROCEDE DE PREPARATION

La présente invention concerne des composés oligonucléotides phosphorothioates triesters et un procédé de préparation.

Dans la présente demande, le terme "oligonucléotides" désigne d'une façon générale un polynucléotide d'ADN ou d'ARN, c'est-à-dire en série ribo- (ARN) ou désoxyribo- (ADN), ou encore mixte ribo-désoxyribo. Ces oligonucléotides sont constitués en général d'un enchainement de 2 à 100, et plus généralement, de 5 à 50 nucléotides.

Les oligonucléotides sont utilisés à des fins biologiques ou thérapeutiques selon différentes approches : antisens (formation de duplex), anti-gène (formation de triples hélices), catalytique (ARN à activité ribozymique) ou sens (protéine cible).

Les oligonucléotides antisens sont de courtes molécules synthétiques d'ADN -ou d'ARN- ou mixtes, de séquences complémentaires à une séquence cible appartenant à un gène ou à un ARN messager dont on désire bloquer spécifiquement l'expression. Les oligonucléotides antisens sont en effet dirigés contre une séquence d'ARN messager, ou bien contre une séquence d'ADN et s'hybrident à la séquence dont ils sont complémentaires, pouvant ainsi bloquer l'expression génétique.

Les désoxyribonucléotides antisens peuvent également être dirigés contre certaines régions d'ADN bicaténaire (séquences homopurines/homopyrimidines ou riches en purines/pyrimidines) et former ainsi des triples hélices. Ces oligonucléotides dirigés ainsi contre l'ADN ont été appelés "anti-gène" ou encore "anti-code". La formation d'une triple hélice, au niveau d'une séquence particulière, peut bloquer la fixation de protéines intervenant dans l'expression d'un gène et/ou permettre d'introduire de dommages irréversibles dans l'ADN si l'oligonucléotide considéré possède un groupement réactif particulier. De tels oligonucléotides antisens peuvent constituer des endonucléases de restriction artificielles, dirigées contre des séquences spécifiques.

Dans les cellules, et plus particulièrement dans un organisme, dans la circulation sanguine par exemple, les oligonucléotides naturels sont sensibles à la dégradation par les nucléases. Les nucléases sont des enzymes de dégradation capables de couper les liaisons phosphodiester de l'ADN ou de l'ARN, soit en introduisant des coupures internes sur des molécules mono- ou bicaténaires, soit en attaquant ces molécules à partir

de leurs extrémités. Les enzymes qui attaquent de façon interne sont appelées les endonucléases et celle attaquant par les extrémités sont appelées exonucléases.

L'utilisation des oligonucléotides se heurte à deux problèmes majeurs qui sont d'une part, une grande sensibilité à la dégradation par des exonucléases, qui se trouvent aussi bien dans le sérum ou en milieu extra-cellulaire ou en milieu cytoplasmique intracellulaire et, d'autre part, une faible pénétration intracellulaire.

L'utilisation d'oligonucléotides modifiés a déjà été proposée pour augmenter la stabilité des oligonucléotides ou favoriser la pénétration à travers les membranes cellulaires ou encore pour stabiliser l'hybridation et l'affinité spécifique pour une séquence cible, que ce soit un acide nucléique mono ou double brin, ou même une protéine, ou encore pour accroître l'interaction avec la dite séquence cible. On a proposé des modifications chimiques du squelette structurel de la molécule ou des dérivations ou couplages à des groupements réactifs ou intercalants, en général localisés à l'extrémité des oligonucléotides.

En ce qui concerne les modifications chimiques du squelette, on a proposé de modifier la nature de l'enchaînement phosphate internucléotidique, notamment sous forme de méthyl-phosphonate, phosphorothioate ou phosphorodithioate ; ou encore en modifiant la partie sucre, notamment par une configuration anomérique alpha, une substitution 2'-O-CH<sub>3</sub> ou en remplaçant l'oxygène du cycle furanosique par un soufre (4'-thio-ribonucléotide). On a également proposé de modifier les bases de nucléotides.

Ainsi, dans les demandes de brevet français FR 83 01223 (2 540 122) et FR 84 11795 (2 568 254) ont été décrits des composés chimiques constitués par un oligonucléotide comportant un enchaînement de β-nucléotides naturels ou modifiés, sur lesquels se trouve fixé par une liaison covalente au moins un groupe intercalant, qui possèdent la propriété de bloquer sélectivement l'expression d'un gène et qui, de ce fait, sont particulièrement utiles en thérapeutique comme substances antivirales, antibiotiques, antiparasitaires ou antitumorales.

Dans la demande internationale WO 88/04301 ont été décrits des oligonucléotides de configuration anomérique alpha présentant des appariements parallèles plus stables avec des séquences complémentaires.

Toutefois, les utilisations proposées jusqu'à maintenant soulèvent d'autres problèmes, notamment de toxicité, des modifications chimiques introduites dans la molécule pouvant se révéler induire des toxicités au niveau pharmacologique dans certaines applications thérapeutiques. D'une manière générale, il est difficile de combiner les différents critères de résistance aux nucléases, stabilisation de l'hybridation, pénétration dans la cellule et, également, accroissement de l'activité en rendant le duplex avec la séquence cible complémentaire substrat de la RNase H, laquelle a la propriété de cliver les duplex ADN/ARN.

Les composés oligonucléotides dont la partie phosphate était modifiée en méthyl-phosphonate sont particulièrement résistants à la dégradation par les nucléases. Par ailleurs, les oligomères électriquement neutres comme les oligomères de type méthylphosphonate pénètrent plus facilement dans la cellule que les oligomères électriquement chargés comme les phosphodiesters. Toutefois, ces dérivés méthylphosphonates présentent une chiralité, notamment au niveau du phosphate, conduisant ainsi à la formation de diastéréoisomères. En outre, les duplex ARN/oligodésoxynucléotides méthyl-phosphonate ne sont pas substrats de la RNaseH. Les dérivés oligomères du type phosphorothioates diesters présentent une résistance à la dégradation par les nucléases mais à un degré moindre que les oligomères méthylphosphonates. Ils conduisent en revanche à des oligomères électriquement chargés capables d'activer la RNase H mais pénètrent moins facilement dans la cellule que les oligomères méthylphosphonates.

D'une façon générale, les oligonucléotides faisant l'objet de l'invention sont destinés à fournir de nouveaux oligonucléotides stables capables d'être internalisés dans les cellules et capables de s'hybrider et/ou de présenter une affinité pour des séquences spécifiques d'acides nucléiques ou de protéine et donc d'interagir avec des facteurs cellulaires ou viraux.

La présente invention fournit des oligonucléotides à enchainements phosphorothioates triesters électriquement neutres pouvant redonner, après pénétration dans la cellule, et sélectivement, des

liaisons phosphorothioates diesters ou phosphodiesters polaires. D'une façon analogue, la présente invention inclut des enchainements phosphorodithioates triesters délivrant intracellulairement des liaisons phosphorodithioates diesters ou phosphorothioates diesters.

5 Pour ce faire, on protège sélectivement des liaisons P-S<sup>-</sup> d'un oligomère par un groupement (X) bioréversible dans les milieux intracellulaires.

10 Les modifications proposées selon l'invention fournissent des oligomères ayant les propriétés avantageuses des dérivés phosphorothioates diesters, tout en palliant aux inconvénients de ces derniers, notamment en ce qui concerne leur sensibilité aux exonucléases extracellulaires et leur difficulté de pénétration à travers la membrane cellulaire.

15 La présente invention a donc plus précisément pour objet un oligonucléotide phosphorothioate ou phosphorodithioate triester caractérisé en ce qu'il comporte des enchainements internucléotidiques qui présentent une liaison P-S<sup>-</sup> protégée par un groupement (X) bioréversible dans les milieux intracellulaires.

20 La voie de synthèse utilisée dans cette invention consiste en l'utilisation d'une réaction de substitution nucléophile par l'atome de soufre de la liaison P-S<sup>-</sup> d'un agent alkylant XL, L étant un groupement partant (halogène, ester, tosyl...) et X un groupement bioréversible. Il s'ensuit qu'il est possible de transformer les fonctions P-S<sup>-</sup> en phosphotriesters bioréversibles correspondants, comme il sera montré 25 dans les exemples ci-après.

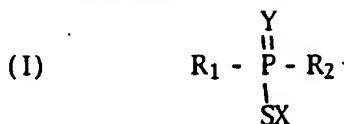
30 Un tel procédé ne nécessite pas une protection des bases hétérocycliques et peut donc être effectué directement sur un oligonucléotide préalablement préparé. On peut ainsi parvenir à des oligomères phosphorothioates triesters à partir d'oligomères phosphorothioates diesters. En effet, un enchaînement mixte comprenant des liaisons phosphodiesters (P-O<sup>-</sup>) et phosphorothioates (P-S<sup>-</sup>) sera sélectivement alkylé au niveau des atomes de soufre.

35 Les oligomères phosphorothioates triesters selon la présente invention sont électriquement neutres dans le milieu extracellulaire et bénéficient de ce fait d'une pénétration améliorée dans la cellule. En

outre, ils permettent de délivrer intracellulairement des oligonucléotides phosphodiesters ou phosphorothioates diesters électriquement chargés susceptibles, à ce titre, d'être substrats de la RNase H lorsqu'ils forment un duplex mixte ARN/ADN avec leurs séquences complémentaires cibles.

5 Le principe de l'invention s'applique à tout oligonucléotide de synthèse, de série ADN, ARN ou mixte, quelle que soit la cible biologique envisagée, dans la mesure où il présente des enchainements internucléotidiques comportant une liaison P-S<sup>-</sup> susceptible d'être alkylée par des groupements bioréversibles.

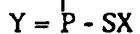
10 Dans un mode de réalisation, les oligonucléotides selon la présente invention répondent à la formule



15 dans laquelle :

- Y représente O ou S
- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont respectivement un résidu en 3'-O et 5'-O d'un nucléoside ou d'un oligonucléotide dont l'enchaînement internucléotidique est naturel ou modifié, notamment dont l'enchaînement est du type

20 phosphorothioate triester de formule



- X est un radical -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Y<sup>1</sup>-W où
  - . Y<sup>1</sup> représente S ou O
  - . n varie de 1 à 6

25 . W représente :

- soit SU avec U qui représente un radical alkyle, aryle, ou osidique éventuellement substitués,
- soit - C - Z avec Y<sup>2</sup> qui représente O ou S, et



30 Z qui représente un radical alkyle, aryle, ou osidique, éventuellement substitués.

On entend ici par "oligonucléotide modifié" des modifications dans la partie sucre, dans la base ou encore dans l'enchaînement phosphate, voire dans la configuration anomérique des enchainements. Ces

groupements X subissent une coupure enzymatique de la liaison Y<sub>1</sub>-W par l'activation enzymatique d'enzymes intracellulaires selon un mécanisme illustré dans la Figure 1.

Lorsque U et Z représentent un radical alkyle, aryle ou osidique, on 5 cite en particulier les radicaux alkyle en C<sub>1</sub> et C<sub>7</sub>, benzyle, phényl, et comme sucres le glucose, mannose ou rhamnose.

Parmi ces groupements X, on cite plus particulièrement -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-S-U ou -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-C(=O)-Z



10 et plus particulièrement encore -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-C(=O)Z, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-S-U, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>S-C(=O)Z



avec n = 1 ou 2.

Ces enchainements phosphorothioates triesters sont transformés sous l'influence d'enzymes intracellulaires, soit en phosphodiesters, soit 15 en phosphorothioates diesters, comme il est montré par les études de décomposition en extraits cellulaires présentées ci-après et les mécanismes indiqués dans la Figure 1.

Parmi les alkyles constituant les groupes U ou Z, on cite en particulier les alkyles inférieurs éventuellement substitués par un groupe 20 choisi parmi hydroxy, SH ou NH<sub>2</sub>.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, X représente -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>-X<sup>1</sup> avec n et n<sup>1</sup> qui représentent un entier de 1 à 4, de préférence 2 et X<sup>1</sup> représente H, OH, SH ou NH<sub>2</sub>, ou X représente -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Y<sup>1</sup>-CO-Z, avec n = 1 ou 2 et Z = CH<sub>3</sub> ou tBu. Plus 25 particulièrement encore X = tBu COOCH<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COSHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, ou CH<sub>3</sub>COSCH<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Les oligomères phosphorothioates diesters électriquement chargés sont quelque peu sensibles à la dégradation nucléasique intracellulaire. C'est pourquoi, dans un mode de réalisation avantageux selon l'invention, les oligonucléotides seront constitués d'un oligomère chimérique 30 comportant une séquence centrale d'ADN ou d'ARN dont les enchainements internucléotidiques comportent une liaison Y = P - SX, cette séquence centrale étant flanquée en 5' et 3' de séquences d'ADN ou ARN modifiées de sorte qu'elles résistent aux nucléases et/ou stabilisent l'hybridation avec un brin complémentaire.

Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux dans le cas d'une approche anti-sens dans laquelle on utilise un oligonucléotide de type ADN, de façon à former un duplex ADN/ARN qui sera ainsi substrat de la RNase H. Ces oligomères chimériques selon l'invention combinent toutes les propriétés avantageuses de pénétration cellulaire, résistance aux enzymes intra- et extracellulaires et formation de duplex substrats de la RNase H.

En particulier, on utilisera des composés de formule I dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> ont des séquences aux extrémités 5' et 3' avec des enchainements internucléotiques, électriquement neutres, qui résistent à la dégradation par les nucléases extra- et intra cellulaires, tels que des enchainements du type méthylphosphonate.

Selon un autre mode de réalisation, les oligonucléotides selon l'invention sont constitués d'un oligomère chimérique comportant une séquence centrale d'ADN ou d'ARN d'anomérie  $\beta$ , dont les enchainements internucléotidiques s sont du type Y = P - SX, cette séquence centrale étant flanquée en 5' et 3' de séquences d'ADN ou d'ARN d'anomérie alpha.

En particulier, un oligonucléotide selon l'invention peut être constitué d'un oligomère chimérique contenant une séquence centrale d'enchainement  $\beta$ -nucléosides phosphorothioates triesters à enchainement internucléotidique de type Y = P - SX encadrée par des flancs constitués de séquences d'enchainements d'alpha nucléosides phosphates diesters.

D'une manière générale, différents nucléotides peuvent rentrer dans la formulation d'oligonucléotides selon l'invention. Les oligonucléotides faisant l'objet de la présente invention peuvent être composés par une séquence de bases nucléotidiques comportant de l'adénine (A), de la guanine (G), de la cytosine (C), de la thymine (T) et de l'uracile (U), ou les oligonucléotides peuvent également comporter des nucléotides rares (Inosine, I, ou rI par exemple) ou des nucléotides modifiés, soit en série désoxyribo-, soit en série ribo-, reliés entre elles par des liaisons phosphodiesters non-modifiées ou modifiées selon la présente invention.

En particulier, les oligonucléotides peuvent comporter des nucléotides réactifs, capables d'établir des liens avec la séquence de la molécule cible complémentaire à l'oligonucléotide.

Ainsi, les oligonucléotides selon l'invention peuvent porter des groupements réactifs greffés sur les nucléotides, comme par exemple des groupements psoralène, ou d'autres agents de pontage ou agents intercalant pouvant réagir avec la séquence de la molécule cible complémentaire à l'oligonucléotide.

Font également partie de l'invention des oligonucléotides couplés à des molécules permettant d'accroître leur pénétration intracellulaire, et en particulier des groupements lipophiles, des polypeptides ou des protéines.

Les oligonucléotides selon l'invention sont préparés à partir d'un oligonucléotide présentant des enchaînements internucléotidiques phosphothioates diesters du type  $Y = P - S^-$ . On effectue une réaction de substitution nucléophile par l'atome de soufre de la liaison  $-P-S^-$  des dits enchaînements phosphorothioates diesters sur un agent alkylant XL conduisant ainsi à la formation d'un oligonucléotide d'enchaînements phosphorothioates triesters  $Y = P - SX$ , L étant un groupe partant tel que halogène, ester, tosyl, et X étant un groupement bioréversible selon l'invention.

Les oligonucléotides phosphorothioates diesters à enchaînement  $Y = P - S^-$  sont préparés par les méthodes conventionnelles de synthèse, par voie chimique, biochimique, ou par des approches faisant appel à des combinaisons des techniques de la chimie de synthèse et de la biologie moléculaire.

Parmi les méthodes qualifiées de conventionnelles, diverses méthodes de synthèse chimique d'oligonucléotides ont été développées et sont bien connues des spécialistes travaillant dans ces domaines. Par exemple, une méthode consiste à utiliser un support solide dit CPG (controlled pore glass) sur lequel le premier nucléoside est fixé covalent par un bras de couplage, par l'intermédiaire de son extrémité 3'OH. L'extrémité 5'OH du nucléoside est protégée par un groupe di-p-méthoxytrityl acido-labile. Cette approche, utilisant la chimie des phosphites triesters, et dans laquelle des désoxynucléosides 3'phosphoramidites sont utilisés comme synthons est appelée la méthode des phosphoramidites. Cette approche est la plus utilisée actuellement et présente l'avantage d'être entièrement automatique.

Une autre approche utilisée pour la synthèse d'oligonucléotides est celle de la chimie des phosphonates. Cette approche commence par la condensation d'un désoxynucléoside 3'-H-phosphonate avec un déoxynucléoside couplé à un support de verre ou de silice. Des cycles de condensation successifs conduisent à la synthèse d'oligonucléotides H-phosphonates. Ces oligonucléotides sont oxydés en une étape pour donner les phosphodiesters.

En utilisant l'une ou l'autre de ces techniques, ou tout autre procédure séquentielle permettant la synthèse de chaînes polynucléotidiques de séquence déterminée à l'avance, on obtient des oligonucléotides présentant la structure de départ désirée.

Des synthèses détaillées d'oligonucléotides phosphorothioates diesters ont été décrites, par exemple, dans J. Am. Chem. Soc. 106: 6077-6079 (1984) et Nucleic Acids Res. 14: 5399-5407 (1986).

Les oligonucléotides peuvent être utilisés à titre de réactifs ou principes actifs dans des compositions diagnostiques, cosmétologiques ou pharmacologiques diverses à des concentrations variables et avec les excipients appropriés selon les applications.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

La Figure 1 représente les mécanismes de décomposition intracellulaire des groupements bioréversibles.

## I - Exemples 1 à 3: synthèse des dinucléosides phosphorothioates triesters 4a, 4b et 4c et évaluation de leur stabilité en milieu biologique

5

### I-1 - synthèse des composés 4a, 4b et 4c

#### Conditions générales:

10 Les chromatographies sur couche mince (C.C.M.) sont réalisées sur plaque de silice Merck 60 F254. Les produits sont détectés à la lampe U.V. (254 nm) et révélés par chauffage après pulvérisation d'acide sulfurique à 10% dans l'éthanol 95°.  
Les chromatographies sur colonne de gel de silice sont effectuées avec de la silice Kieselgel 60 (40µm-63µm).

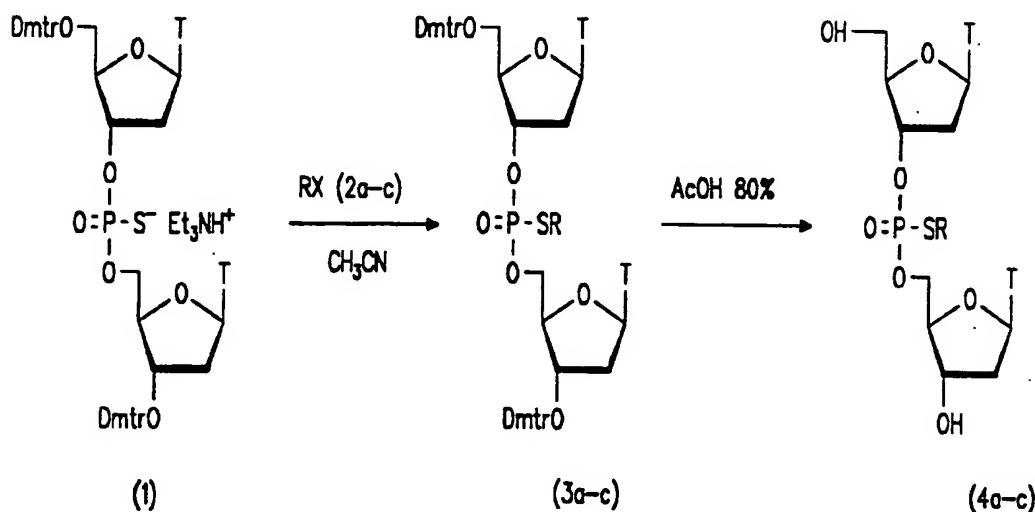
15 Les spectres de RMN du proton sont enregistrés à température ambiante sur un appareil Brüker AC 250. Les échantillons sont solubilisés dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au signal du DMSO-*d*<sub>5</sub> fixé à 2,49 ppm, pris comme référence interne. Les constantes de couplage sont données en Hertz. La multiplicité des signaux observés est indiquée par une lettre minuscule:  
20 m: multiplet; pq: pseudo-quartet; t: triplet; d: doublet; s: singulet; sl: singulet large  
On représente par N<sub>1</sub> le nucléoside ayant sa fonction 5'OH libre et par N<sub>2</sub> le nucléoside ayant sa fonction 3'OH libre.  
Les spectres de RMN du phosphore sont enregistrés à température ambiante sur un appareil Brüker WP 200 SY avec découplage du proton. Les échantillons sont solubilisés  
25 dans CD<sub>3</sub>CN ou dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 66% pris comme référence externe.  
Les spectres de masse sont effectués sur un appareil JEOL JMS DX 300 par la méthode d'ionisation FAB en mode positif avec différentes matrices: glycérol (G), glycérol / thioglycérol (GT) ou alcool 3-nitrobenzylique (NBA).  
30 L'acétonitrile a été distillé après une nuit de chauffage à reflux sur hydrure de calcium et est conservé sur tamis moléculaire (4 Å).  
Les agents d'alkylation ont été synthétisés selon des procédés décrits dans la littérature:  
- iodure de pivaloyloxyméthyle: European Patent Appl N° 843080672  
- bromoéthylacétylsulfure: P. Nylen, A. Olsen, *Svensk Kem. Tid.*, **53**, 274 (1941).  
35 - bromométhylacétylsulfure: G.K. Farrington, A. Kumar, F.C. Wedler, *Oppi briefs*, **21**, 390 (1989).

Les dinucléosides phosphorothioates diesters ont été synthétisés selon des méthodes classiques, décrites dans la littérature, utilisant la chimie des H-Phosphonates (J. Stawinski, M. Thelin, *Nucleosides and Nucleotides*, **9**, 129 (1990); P.J. Garegg, T. Regberg, J; Stawinsky, R. Strömberg, *Nucleosides and Nucleotides*, **6**, 655 (1987)).

5 Des solutions aqueuses d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (TEAB) 1 M et 0,5 M, pH= 7 ont été utilisées pour neutraliser les milieux réactionnels et pour réaliser les extractions.

Avant lyophilisation, les solutions sont filtrées sur filtre Millex HV-4 (Millipore, 0,45  $\mu$  m).

### Synthèse:



a: R = tBuCOOCH<sub>2</sub>- ; b, d: R = CH<sub>3</sub>COSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- ; c: R = CH<sub>3</sub>COSCH<sub>2</sub>-

X = I (a, c et d); Br (b)

### Exemple 1

O-[5'-O-(4,4'-Diméthoxytrityl)thymidin-3'-yl] O-[3'-O-(4,4'-Diméthoxytrityl)thymidin-5'-yl] S-(pivaloyloxyméthyl) Phosphorothioate (3a):

A une solution de dinucléoside phosphorothioate diester (1) (254 mg; 0,2 mmol.) dans l'acétonitrile anhydre (10 ml) est additionné l'iode de pivaloyloxyméthyle (2a) (484 mg, 2 mmol.). La réaction est agitée à température ambiante durant 30 minutes, puis le milieu

réactionnel est neutralisé par addition d'une solution aqueuse de TEAB 1 M (2 ml) et laissé sous agitation durant 5 minutes. Puis le mélange réactionnel est versé sur une solution aqueuse de TEAB 0,5 M (50 ml) et extrait avec du dichlorométhane ( $3 \times 30$  ml). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau (50 ml), séchées sur sulfate de sodium, filtrés puis évaporées à sec. Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un gradient de méthanol (0 à 2%) dans le dichlorométhane. Les fractions contenant (3a) sont rassemblées et concentrées sous pression réduite pour conduire à un résidu solide blanc (220 mg; 86%) qui est soigneusement séché pour être utilisée dans l'étape suivante.

10

$R_f = 0,67$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ : 9 / 1).

15

□ O-(Thymidin-3'-yl) O-(Thymidin-5'-yl) S-(pivaloyloxyméthyl) Phosphorothioate (4a):

15

Le dimère phosphorothioate triester totalement protégé (3a) est dissous dans un mélange acide acétique / eau / méthanol (8:1:1, v:v:v) (10 ml). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 5 heures. On évapore alors le milieu réactionnel et on coévapore plusieurs fois à l'eau et au toluène. Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un gradient de méthanol (0 à 10%) dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le produit (4a) sont rassemblées, concentrées sous pression réduite, puis le résidu est coévaporé plusieurs fois au dioxane et lyophilisé dans le dioxane.

25

On obtient (4a) sous forme d'une poudre blanche (98 mg, 85%).

25

$R_f = 0,2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ : 9 / 1)

MS: FAB>0 (NBA): 677:  $(\text{M}+\text{H})^+$ ; 551:  $(\text{M}-\text{B})^+$ ; 424:  $(\text{M}-(2\text{B}+2\text{H}))^+$

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta = 27,21$  et  $27,31$  ppm (2 diastéréoisomères)

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11,34$  (sl, 2H, 2NH); 7,68 et 7,48 (2m, 2H, 2H<sub>6</sub>); 6,21 (m, 2H, 2H<sub>1'</sub>); 5,48 (d, 1H, OH<sub>3'</sub>, J = 4,4 Hz); 5,41 (d, 2H, SCH<sub>2</sub>O, J = 20 Hz); 5,26 (t, 1H, OH<sub>5'</sub>, J = 5,1 Hz), 5,10 (m, 1H, H<sub>3'</sub> (N<sub>1</sub>)); 4,26 (m, 3H, H<sub>3'</sub> (N<sub>2</sub>), H<sub>5'</sub> et H<sub>5''</sub> (N<sub>2</sub>)); 4,12 (m, 1H, H<sub>4'</sub> (N<sub>1</sub>)); 3,96 (m, 1H, H<sub>4'</sub> (N<sub>2</sub>)); 3,61 (m, 2H, H<sub>5'</sub> et H<sub>5''</sub> (N<sub>1</sub>)); 2,38 (m, 2H, H<sub>2'</sub> et H<sub>2''</sub> (N<sub>1</sub>)); 2,14 (m, 2H, H<sub>2'</sub> et H<sub>2''</sub> (N<sub>2</sub>)); 1,79 et 1,77 (2s, 2CH<sub>3</sub> (N<sub>1</sub> et N<sub>2</sub>)); 1,13 (d, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C) ppm.

35

Exemple 2

**O-[5'-O-(4,4'-Diméthoxytrityl)thymidin-3'-yl] O-[3'-O-(4,4'-Diméthoxytrityl)thymidin-5'-yl] S-(acétylthioéthyl) Phosphorothioate (3b):**

A une solution de dinucléoside phosphorothioate diester (1) (50 mg; 0,0394 mmol.) dans l'acétonitrile anhydre (5 ml) est additionné le bromoéthylacétylsulfure (2b) (360 mg; 1,97 mmol.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 5 jours, puis il est neutralisé par addition d'une solution aqueuse de TEAB 1 M (1 ml) et laissé sous agitation pendant 5 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite versé sur une solution aqueuse de TEAB 0,5 M (25 ml) et extrait avec du dichlorométhane ( $3 \times 15$  ml). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau (25 ml), séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis évaporées à sec. Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un gradient de méthanol (0 à 4%) dans le dichlorométhane. On obtient (3b) sous forme d'un solide blanc (27 mg, 55%).

15  $R_f = 0,75$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ : 9 / 1).

**O-(Thymidin-3'-yl) O-(Thymidin-5'-yl) S-(acétylthioéthyl) Phosphorothioate (4b):**

20 Le dinucléoside phosphorothioate triester totalement protégé (3b) est dissous dans un mélange acide acétique / eau / méthanol (8:1:1, v:v:v) (5 ml) et laissé sous agitation toute une nuit. Le lendemain, on évapore le milieu réactionnel et on coévapore plusieurs fois à l'eau puis au toluène. Le résidu solide est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un gradient de méthanol (0 à 10%) dans le dichlorométhane. Les fractions contenant le dinucléoside phosphorothioate triester détritylé (4b) sont rassemblées, évaporées sous pression réduite, puis le résidu est coévaporé au dioxane et lyophilisé dans le dioxane. On obtient (4b) sous forme d'une poudre blanche (12 mg, 86%).

30  $R_f = 0,35$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ : 9 / 1)

MS: FAB>0 (GT): 665:  $(\text{M}+\text{H})^+$

RMN  $^{31}\text{P}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 28,09$  et  $28,22$  ppm

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11,34$  (2s, 2H, 2NH); 7,68 et 7,48 (2d, 2H, 2H<sub>6</sub>); 6,20 (t, 2H, 2H<sub>1</sub>); 5,48 (d, 1H, OH<sub>3</sub>), 5,26 (pq, 1H, OH<sub>5</sub>), 5,09 (m, 1H, H<sub>3'</sub> (N<sub>1</sub>)), 4,26 (m, 3H, H<sub>3'</sub> (N<sub>2</sub>), H<sub>5'</sub> et H<sub>5''</sub> (N<sub>2</sub>)); 4,10 (m, 1H, H<sub>4'</sub> (N<sub>1</sub>)); 3,95 (m, 1H, H<sub>4'</sub> (N<sub>2</sub>)); 3,61

35 (m, 2H, H<sub>5'</sub> et H<sub>5''</sub> (N<sub>1</sub>)); 3,13 et 3,02 (2m, 4H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 2,29 (m, 2H, H<sub>2'</sub> et H<sub>2''</sub>

(N<sub>1</sub>)); 2,33 (d, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 2,13 (m, 2H, H<sub>2'</sub> et H<sub>2''</sub>(N<sub>2</sub>)); 1,77 et 1,78 (2s, 6H, 2CH<sub>3</sub> (N<sub>1</sub> et N<sub>2</sub>)) ppm.

### Exemple 3

5

O-[5'-O-(4,4'-Diméthoxytrityl)thymidin-3'-yl] O-[3'-O-(4,4'-Diméthoxytrityl)thymidin-5'-yl] S-(acétylthiométhyl) Phosphorothioate (3c):

A une solution de dinucléoside phosphorothioate diester (1) (58 mg; 0,0457 mmol.) dans l'acetonitrile anhydre (5 ml) est additionné l'iodométhylacétylsulfure (98 mg; 0,457 mmol.). La réaction est laissée sous agitation toute une nuit à température ambiante, puis le milieu réactionnel est neutralisé par addition d'une solution aqueuse de TEAB 1 M (1 ml) et laissé sous agitation durant quelques minutes. Puis le mélange réactionnel est versé sur une solution aqueuse de TEAB 0,5 M (25 ml) et extrait avec du dichlorométhane (3 × 15 ml). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau (25 ml), séchées sur sulfate de sodium, filtrées puis évaporées à sec. Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un gradient de méthanol (0 à 3%) dans le dichlorométhane. On obtient (3c) sous forme d'un solide blanc (46 mg, 80%).

20 R<sub>f</sub> = 0,55 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH : 9 / 1).

O-(thymidin-3'-yl) O-(thymidin-5'-yl) S-(acétylthiométhyl) Phosphorothioate (4c):

25 Le dinucléoside phosphorothioate totalement protégé (3c) est dissous dans un mélange acide acétique / eau / méthanol (8:1:1, v:v:v) (5 ml) et laissé sous agitation à température ambiante toute une nuit, Le lendemain, on évapore le milieu réactionnel et on coévapore plusieurs fois à l'eau et au toluène, Le résidu est ensuite chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant un gradient de méthanol (0 à 10%), Les fractions contenant le dinucléoside phosphorothioate triester détritylé (4c) sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est coévaporé au dioxane puis lyophilisé dans le dioxane, On obtient (4c) sous forme d'une poudre blanche (20 mg, 85%).

R<sub>f</sub> = 0,62 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH : 8 / 2 )

35 MS: FAB>0 (GT): 651 (M+H)<sup>+</sup>

RMN <sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>CN): δ = 27,22 et 27,44 ppm (2 diastéréoisomères),

5      RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta =$  : 11,34 (d, 2H, 2 NH); 7,70 et 7,49 (2d, 2H, 2H<sub>6</sub>); 6,22 (m, 2H, 2H<sub>1'</sub>); 5,48 (d, 1H, OH<sub>3'</sub>); 5,37 (m, 1H, OH<sub>5'</sub>); 5,08 (m, 1H, H<sub>3'</sub> (N<sub>1</sub>)); 4,29 (m, 5H, H<sub>3'</sub> (N<sub>2</sub>), H<sub>5'</sub> et H<sub>5''</sub> (N<sub>2</sub>), SCH<sub>2</sub>S); 4,13 (m, 1H, H<sub>4'</sub> (N<sub>1</sub>)); 3,97 (m, 1H, H<sub>4'</sub> (N<sub>2</sub>)); 3,62 (m, 2H, H<sub>5'</sub> et H<sub>5''</sub> (N<sub>1</sub>)), 2,39 (m, 5H, H<sub>2'</sub> et H<sub>2''</sub> (N<sub>1</sub>), CH<sub>3</sub>CO); 2,15 (m, 2H, H<sub>2'</sub> et H<sub>2''</sub> (N<sub>2</sub>)); 1,78 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> (N<sub>1</sub> et N<sub>2</sub>)).

## I-2 - Etudes de stabilité des dimères phosphorothioates triesters **4a**, **4b** et **4c**

10

### Conditions générales:

#### ● Méthode

15

La stabilité des dimères (**4a**), (**4b**) et (**4c**) dans différents milieux biologiques a été étudiée selon une technique C.L.H.P. mise au point au laboratoire (A, Pompon, I, Lefebvre, J.-L, Imbach, *Biochemical Pharmacology*, **43**, 1769 (1992).), qui ne nécessite aucune manipulation préalable de l'échantillon et permet son injection directe: une précolonne, 20 qui permet d'éliminer les protéines, remplie d'un nouveau matériau I.S.R.P. (Internal Surface Reverse Phase) est associée à une colonne haute résolution (phase inverse) permettant l'analyse chromatographique.

25

#### Le chromatographe (Waters-Millipore) est composé de :

- un programmateur M 680
- deux pompes M 510
- un injecteur automatique WISP 712
- un détecteur U.V. à barrette de diodes M 990
- un microordinateur NEC APC IV
- une imprimante Waters 990
- une vanne 6 voies modèle 7010 (Rhéodyne),

#### Les colonnes sont fournies par la S.F.C.C.-Shandon:

- Précolonne I.S.R.P. (Ultrabiosep C 18, 10  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm  $\times$  10 mm)
- Colonne analytique phase inverse (Nucléosil C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm  $\times$  100 mm)

La colonne analytique est thermostatée à 30°C,

L'exploitation des résultats se fait sur le logiciel EUREKA.

● Produits chimiques:

- 5 L'eau distillée est purifiée sur un système MilliQ (Waters-Millipore),  
L'acétonitrile est de qualité H.P.L.C.-lointain U.V. (Fisons),  
L'acétate d'ammonium est de qualité "pour analyses" (MERCK),  
Les milieux de culture sont composés de 90% de RPMI 1640 et de 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (GIBCO),
- 10 Les extraits cellulaires ont été aimablement fournis par Melle A.-M. Aubertin (Université de Strasbourg I). Ils sont préparés de la façon suivante: des cellules CEM en croissance exponentielle sont séparées du milieu de culture par centrifugation ( $10^4$ g, 4 min, 4°). Le résidu (environ 100 µl,  $5.10^7$  cellules) est mis en solution dans 2 ml de tampon (Tris-HCl 140 mM, pH=7,4) et soniqué. Le lysat est centrifugé ( $10^5$ g, 1h, 4°)
- 15 pour éliminer les membranes, les organites et la chromatine.  
Deux types d'éluants ont été utilisés pour la C.L.H.P.:
  - éluant A: Tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH = 5,9,
  - éluant B: Tampon acétate d'ammonium 0,1 M, acétonitrile 50%, pH = 5,9,

20 ● Préparation des échantillons:

On prépare une solution  $10^{-2}$  M du composé à étudier dans le DMSO.

Cette solution est diluée avec de l'eau pour conduire à une solution mère de concentration  $5.10^{-4}$  M.

25

a) - étude de stabilité en milieu de culture:

- 100 µl de solution mère du composé à étudier sont ajoutés à 900 µl de milieu de culture préalablement filtrés sur filtre stérile Millex GV (Millipore, 0,22 µm). Après mélange, des fractions (100 µl) sont réparties dans des tubes Eppendorf stériles. Ces tubes sont placés dans une étuve à 37°C et prélevés en fonction de l'évolution cinétique. Les échantillons sont immédiatement analysés par C.L.H.P. (volume injecté: 80 µl) ou conservés à -25°C en vue d'une analyse ultérieure.

35

b) - étude de stabilité en extrait cellulaire:

100 µl de solution mère du composé à étudier sont ajoutés à 900 µl d'extrait cellulaire préalablement filtrés sur filtre stérile Millex GV (Millipore, 0,22 µm). Après mélange, des fractions (100 µl) sont réparties dans des tubes Eppendorf. Ces tubes sont placés dans une étuve à 37°C et prélevés en fonction de l'évolution cinétique. Les échantillons sont 5 immédiatement analysés par C.L.H.P..

### Résultats:

10 Les résultats concernant les études de stabilité des trois dimères (4a), (4b) et (4c) sont rassemblées dans le tableau ci-dessous:

$$C_0 = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$t_{1/2}$  = temps au bout duquel la moitié du produit de départ s'est décomposée

15 PO<sup>-</sup> = dinucléoside phosphodiester

PS<sup>-</sup> = dinucléoside phosphorothioate diester

% PO<sup>-</sup>, % PS<sup>-</sup> = fractions molaires de dinucléoside phosphodiester et de dinucléoside phosphorothioate diester, exprimées par rapport à la quantité initiale de dinucléoside phosphorothioate triester.

20 Le pourcentage de PS<sup>-</sup> correspond à la quantité de dinucléoside phosphorothioate diester formé après décomposition complète du dinucléoside phosphorothioate triester de départ (en considérant que le dinucléoside phosphorothioate diester est stable dans les conditions utilisées et s'accumule).

25 Le pourcentage de PO<sup>-</sup> est calculé par la différence (100 - % PS<sup>-</sup> formé) car le dinucléoside phosphodiester se décompose rapidement dès sa formation.

		RPMI + 10% sérum		extrait cellulaire		
	$t_{1/2}$	% PO <sup>-</sup>	% PS <sup>-</sup>	$t_{1/2}$	% PO <sup>-</sup>	% PS <sup>-</sup>
(4a)	6 h	80	20	40 min	/	100
(4b)	7 h	50	50	10 min	/	100
(4c)	1 h	20	80	5-10 min	/	100

Il découle de l'étude de stabilité des composés 4a-c présentée ci-dessus que ceux-ci sont rapidement et sélectivement transformés en extrait cellulaire en leur phosphorothioate diester correspondant, ce qui est en accord avec l'hypothèse originelle.

5

**II - Exemples 4 à 6: synthèse d'oligonucléotides contenant des liaisons phosphorothioates triesters par alkylation post-synthèse de liaisons phosphorothioates diesters. Evaluation de leur stabilité  
10 en milieux biologiques**

**II-1 - synthèse des oligonucléotides 5c, 6b et 7b contenant des liaisons phosphorothioates triesters**

15

**Conditions générales:**

Les oligonucléotides contenant des liaisons phosphorothioates diesters ont été synthétisés en phase solide sur un synthétiseur d'ADN Applied Biosystems modèle 381 A, sur des  
20 colonnes de support correspondant à une µmole de nucléoside gréffé.

La purification et l'analyse des oligonucléotides 5c, 6b et 7b ont été effectuées par C.L.H.P. en utilisant un système chromatographique composé de matériel Waters-Millipore:

- un programmateur M 680
- 25 - un ordinateur NEC APC IV
- une imprimante Waters 990
- deux pompes M 510
- un injecteur U<sub>6</sub>K
- un détecteur U.V. à barrettes de diode

30 Les colonnes et les précolonnes sont fournies par la SFCC-Shandon:

- dans le cas de C.L.H.P. préparative, on a utilisé une colonne Nucléosil C<sub>18</sub> N 525 (10mm × 250 mm) de granulométrie 5 µm protégée par une précolonne Nucléosil C<sub>18</sub> PSF-25 de granulométrie 5 µm.
- dans le cas de C.L.H.P. analytique, on a utilisé une colonne Nucléosil C<sub>18</sub> N 125 (4,6mm × 150 mm) de granulométrie 5 µm protégée par une précolonne Nucléosil C<sub>18</sub> PSF-25 de granulométrie 5 µm.

Après purification, les oligonucléotides sont filtrés sur filtre Millex HV-13 (Millipore, 0,45 µm) et soumis à plusieurs lyophilisations successives dans l'eau.

Le suivi des réactions d'alkylation des oligonucléotides et la purification des 5 oligonucléotides alkylés 5c, 6b et 7b ont été effectués par C.L.H.P., sur un chromatographe Waters-Millipore composé de :

- un programmateur 600 E
- un système de pompage 600
- un injecteur manuel U6K
- 10 - un détecteur U.V. 486
- un micro-ordinateur Powermate SX Plus

Le suivi des réactions d'alkylation a été réalisé sur une colonne Nucléosil C<sub>18</sub> 5µm (4,6mm × 150 mm) protégée par une précolonne Nucléosil C<sub>18</sub> 5µm (S.F.C.C.- Shandon).

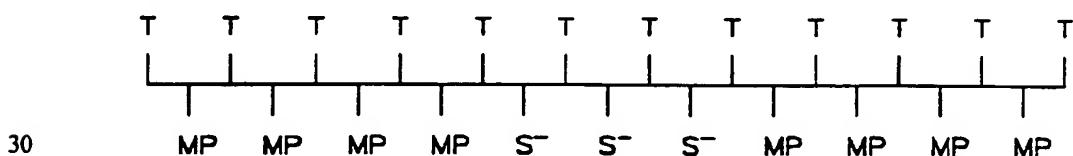
15 La purification des oligonucléotides 5c, 6b et 7b a été effectuée sur une cartouche RADIAL-PAK C<sub>18</sub> 10µm pour support de colonne RCM (8 × 10), protégée par une précolonne GUARD-PAK Resolve C<sub>18</sub> (Waters-Millipore).

Le dessalage des échantillons a été réalisé sur une cartouche C<sub>18</sub> SEP-PAK (Waters- Millipore).

20 Avant lyophilisation, les solutions sont filtrées sur filtre Millex HV-13 (Millipore, 0,45 µ m).

**II-1-1 - Exemple 4: synthèse du dodécamère chimérique 5c contenant une fenêtre centrale phosphorothioate triester et des flancs 25 méthylphosphonates.**

a) - synthèse d'un dodécamère contenant une fenêtre centrale phosphorothioate diester et des flancs méthylphosphonates.



On a utilisé le cycle standard d'elongation proposé pour la synthèse des oligonucléotides, en utilisant pour les flancs le synthon méthylphosphonamidite et le mélange I<sub>2</sub> / THF / eau / pyridine comme agent d'oxydation, et pour la partie centrale (3 cycles 35 d'incorporations) le synthon cyanoéthylphosphoramidite et le réactif de Beaucage comme

agent de sulfuration (R.P. Iyer, W. Egan, J.B. Regan, S.L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1253 (1990)).

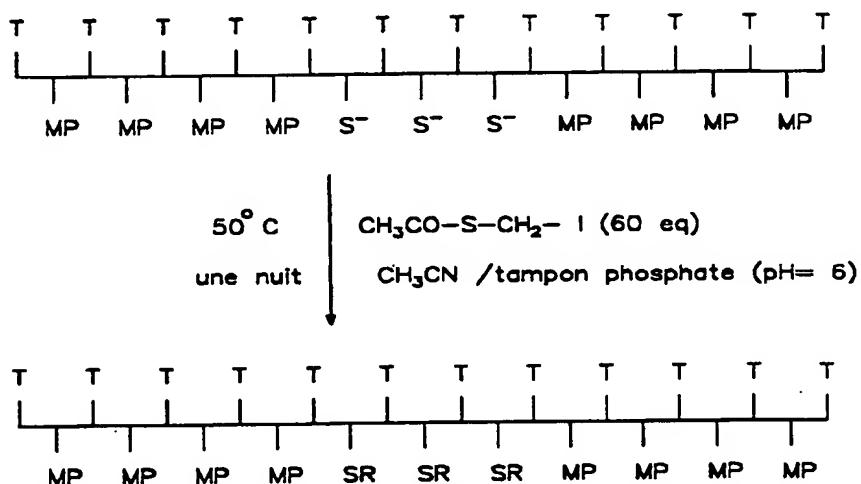
Le décrochage de l'oligonucléotide du support et sa déprotection ont été réalisés selon le procédé classiquement décrit pour les méthylphosphonates (P.S. Miller, M.P. Reddy, A.

5 Murakami, K.R. Blake, S.B. Lin, C.H. Agris, *Biochemistry*, **25**, 5092 (1986).) en utilisant une solution d'éthylenediamine dans l'éthanol absolu (1:1, v:v).

La synthèse sur l'échelle d'une micromole nous a conduit à un brut de synthèse de 75 unités d'absorbance à 260 nm (unités A<sub>260</sub>).

10 Après purification par C.L.H.P. préparative, nous avons obtenu 37 unités A<sub>260</sub> d'oligonucléotide chimérique d'une pureté spectrophotométrique de 100% (déterminée par analyse C.L.H.P.).

15 b) - Alkylation des liaisons phosphorothioates diesters .



Dans un eppendorf, on introduit successivement:

20 - 120 µl d'acetonitrile  
 - 135 µl de tampon phosphate 20 mM (pH = 6,15)  
 - 15 µl d'iodométhylacétylsulfure en solution 0,92 M dans l'acetonitrile  
 - 30 µl de solution 7,66 mM d'oligonucléotide dans l'eau (soit environ 22 unités A<sub>260</sub>)

25 L'eppendorf est placé dans un bain à sec préalablement thermostaté à 50°C.  
 Des prélèvements de 5 µl sont effectués à différents temps de réaction et sont analysés par C.L.H.P. afin d'estimer l'avancement de la réaction.

Après 16 heures de réaction, on ne détecte plus la présence de l'oligonucléotide de départ ( $t_r = 12,99$  min) et l'oligonucléotide totalement alkylé ( $t_r = 17,53$  min) est purifié par C.L.H.P..

5 L'oligonucléotide est ensuite dessalé, avant d'être lyophilisé dans un mélange eau / dioxane (50:50, v:v) et analysé à nouveau par C.L.H.P..

On a obtenu 10 unités A<sub>260</sub> d'oligonucléotide totalement alkylé d'une pureté spectrophotométrique de 97% (déterminée par C.L.H.P.).

10

**II-1-2 - exemple 5: synthèse du dodécamère 6b entièrement phosphorothioate triester.**

a) - synthèse d'un dodécamère phosphorothioate diester  
15 d(CP(S)AP(S)CP(S)CP(S)CP(S)AP(S)AP(S)TP(S)TP(S)CP(S)TP(S)G)

On a utilisé le cycle standard d'elongation proposé pour la synthèse d'oligonucléotides en utilisant les synthons cyanoéthylphosphoramidites des quatre bases convenablement protégés et en remplaçant l'étape d'oxydation par I<sub>2</sub> / THF / eau / pyridine par une étape 20 de sulfuration avec le réactif de Beaucage.

Le décrochage de l'oligonucléotide du support et sa déprotection ont été réalisées par un traitement à l'ammoniaque concentré (32%) pendant une nuit à 55°C.

b) - alkylation des liaisons phosphorothioates diesters.

25

A une solution 6,4 mM d'oligonucléotide phosphorothioate diester, d(CP(S)AP(S)CP(S)CP(S)CP(S)AP(S)AP(S)TP(S)TP(S)CP(S)TP(S)G) dans de l'eau (42 µl) on ajoute successivement du tampon phosphate (pH= 6,15, 123 µl), de l'acetonitrile (120 µl) et une solution 1 M d'iodoéthylacétysulfure (2d) (55 µl). Le mélange est maintenu à 50°C pendant 48 heures. Après évaporation, le résidu est purifié par C.L.H.P.. La fraction contenant le dodécamère phosphorothioate entièrement alkylé 6b est dessalé et le résidu d'évaporation repris dans un mélange eau / dioxane (50:50, v:v, 1 ml) est lyophilisé.

Rendement 35%. La référence (2d) se rapporte à la nomenclature utilisée dans le schéma de synthèse du paragraphe I-1.

**II-1-3 - exemple 6:** synthèse du dodécamère chimérique **7b** contenant une fenêtre centrale constituée de  $\beta$ -nucléosides phosphorothioates triesters et des flancs constitués d' $\alpha$ -nucléosides phosphates diesters.

5    a) - synthèse du dodécamère contenant une fenêtre  $\beta$ -phosphorothioate diester et  
des flancs  $\alpha$ -phosphates diesters d[ $\alpha$ -(TCTT)3'→3' $\beta$ -(TP(S)TP(S)CP(S)C)5'→5' $\alpha$ -(CTCT)]

On a utilisé le cycle standard d'elongation proposé pour la synthèse des oligonucléotides  
10 en utilisant pour les flancs les synthons cyanoéthylphosphoramidites d'anomérie  $\alpha$  convenablement protégés sur les bases et le mélange I<sub>2</sub> / THF / eau / pyridine comme agent d'oxydation, et pour la partie centrale les synthons cyanoéthylphosphoramidites d'anomérie  $\beta$  convenablement protégés sur les bases et le réactif de Beaucage comme agent de sulfuration.

15

**b) - alkylation des liaisons phosphorothioates diesters.**

A une solution 11 mM d'oligonucléotide d[ $\alpha$ -(TCTT)3'→3' $\beta$ -(TP(S)TP(S)CP(S)C)5'→5' $\alpha$ -(CTCT)] dans de l'eau (20  $\mu$ l), on ajoute successivement du tampon phosphate (pH= 20 6,15, 145  $\mu$ l) et une solution 1 M d'iodoéthylacétysulfure (**2d**) (55  $\mu$ l). Le mélange est maintenu à 50°C pendant 48 heures. Après évaporation, le résidu est purifié par C.L.H.P.. La fraction contenant le dodécanucléotide (**7d**) alkylé sur les trois liaisons phosphorothioates centrales est dessalée puis lyophilisée. Rendement 47%.

25            **II-2 - Etude de stabilité des oligonucléotides chimériques 5c,  
6b et        7b dans des milieux biologiques.**

**Conditions générales:**

30 Les conditions générales sont les mêmes que celles utilisées pour les études de stabilité des dimères phosphorothioates triesters, en ce qui concerne la méthode, le matériel et les produits chimiques

**Préparation des échantillons:**

35 on prépare une solution mère d'oligonucléotide dans le dioxane (10 unités A<sub>260</sub> d'oligonucléotide dans 200  $\mu$ l de dioxane).

**a) - étude de stabilité en milieu de culture:**

On prélève 30 µl de solution mère d'oligonucléotide (soit environ 1,5 unités A<sub>260</sub>), que l'on ajoute à 1470 µl de milieu de culture préalablement filtré sur filtre stérile Millex GV (Millipore, 0,22 µm). Après mélange, des fractions (100 µl) sont réparties dans des tubes Eppendorf stériles. Ces tubes sont placés dans une étuve à 37°C et prélevés en fonction de l'évolution cinétique. Les échantillons sont immédiatement analysés par C.L.H.P. (volume injecté 80 µl) ou conservés à -25°C en vue d'une analyse ultérieure.

**10 b) - étude de stabilité en extrait cellulaire:**

10 µl de solution mère d'oligonucléotide sont ajoutés à 990 µl d'extrait cellulaire préalablement filtrés sur filtre stérile Millex GV (Millipore, 0,22 µm). Après mélange, des fractions (100 µl) sont réparties dans des tubes Eppendorf stériles, placées dans une étuve à 37°C, prélevées à des temps différents et immédiatement analysées par C.L.H.P..

**Résultats:**

Les résultats concernant les études de stabilité des trois oligonucléotides 5c, 6b et 7b sont rassemblés dans le tableau ci-dessous

	RPMI + 10% sérum		extrait cellulaire	
	oligonucléotide étudié	t <sub>1/2</sub> de disparition de l'oligonucléotide de départ	t <sub>1/2</sub> de disparition de l'oligonucléotide de départ	t <sub>1/2</sub> de formation de l'oligonucléotide totalement déprotégé
25	<u>5c</u>	40 min	< 5 min	20 min
	<u>6b</u>	55 min	< 2 min	25 min
30	<u>7b</u>	35 min	< 2 min	20 min

24

L'ensemble des données concernant les composés 5c, 6b et 7b montre sans ambiguïté qu'il est possible de protéger sélectivement par des groupements bioréversibles des fonctions internucléotidiques phosphorothioates. De plus, il est bien confirmé en extrait cellulaire que de tels oligonucléotides phosphorothioates triesters sont rapidement déprotégés.

La Figure 1 représente le mécanisme de décomposition des groupements bioréversibles selon l'invention.

10

15

20

25

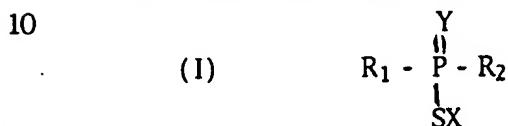
30

35

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide phosphorothioate triester caractérisé en ce qu'il comporte des enchainements internucléotidiques qui présentent une liaison P-S- protégée par un groupement (X) bioréversible dans les milieux intracellulaires.

2. Oligonucléotide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale suivante



dans laquelle :

- Y représente O ou S
- 15 - R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont respectivement un résidu 3'-O et 5'-O d'un nucléoside ou d'un oligonucléotide dont l'enchaînement internucléotidique est naturel ou modifié, notamment dont l'enchaînement est du type phosphorothioate triester de formule

$$Y = P - SX$$

20 - X est un radical -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Y<sup>1</sup>-W où

- . Y<sup>1</sup> représente S ou O

- . n varie de 1 à 6

- . W représente :

- soit SU avec U qui représente un radical alkyle, aryle, ou osidique éventuellement substitués,

- soit -C-Z avec Y<sup>2</sup> qui représente O ou S, et

$$\begin{array}{c} || \\ Y_2 \end{array}$$

Z qui représente un radical alkyle, aryle, ou osidique éventuellement substitués.

30

3. Oligonucléotide selon la revendication 2 caractérisé en ce que X représente -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-S-U ou -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-C-Z

$$\begin{array}{c} || \\ Y_2 \end{array}$$

4. Oligonucléotide selon la revendication 2 ou 3 caractérisé en ce que X représente  $-(CH_2)_n \overset{\text{||}}{\underset{\text{O}}{\text{O}}} \text{C Z}$ ,  $-(CH_2)_n \text{-S-S-U}$ ,  $-(CH_2)_n \overset{\text{||}}{\underset{\text{O}}{\text{O}}} \text{SC Z}$ , avec n = 1 ou 2.

5 5. Oligonucléotide selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisé en ce que U et Z sont un alkyl inférieur éventuellement substitué par un ou des groupe(s) choisi(s) parmi OH, SH, ou NH<sub>2</sub>.

10 6. Oligonucléotide selon la revendication 5 caractérisé en ce que X représente  $-(CH_2)_n \text{-S-S-} (CH_2)_{n^1} \text{-X}^1$  avec n et n<sup>1</sup> qui représentent un entier de 1 à 4, de préférence 2 et X<sup>1</sup> représente H, OH, SH ou NH<sub>2</sub>, ou X représente  $-(CH_2)_n \text{-Y}^1 \text{-CO-Z}$ , avec Z = CH<sub>3</sub> ou tBu.

15 7. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est constitué d'un oligomère chimérique comportant une séquence centrale d'ADN ou d'ARN dont les enchainements internucléotidiques comportent une liaison Y = P - SX, cette séquence centrale étant flanquée en 5' et 3' de séquences d'ADN ou ARN modifiées de sorte qu'elles résistent aux nucléases et/ou stabilisent l'hybridation avec 20 un brin complémentaire.

25 8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 2 à 7 caractérisé en ce que R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> ont des séquences aux extrémités 5' et 3' respectivement, électriquement neutres, et qui résistent à la dégradation par les exonucléases.

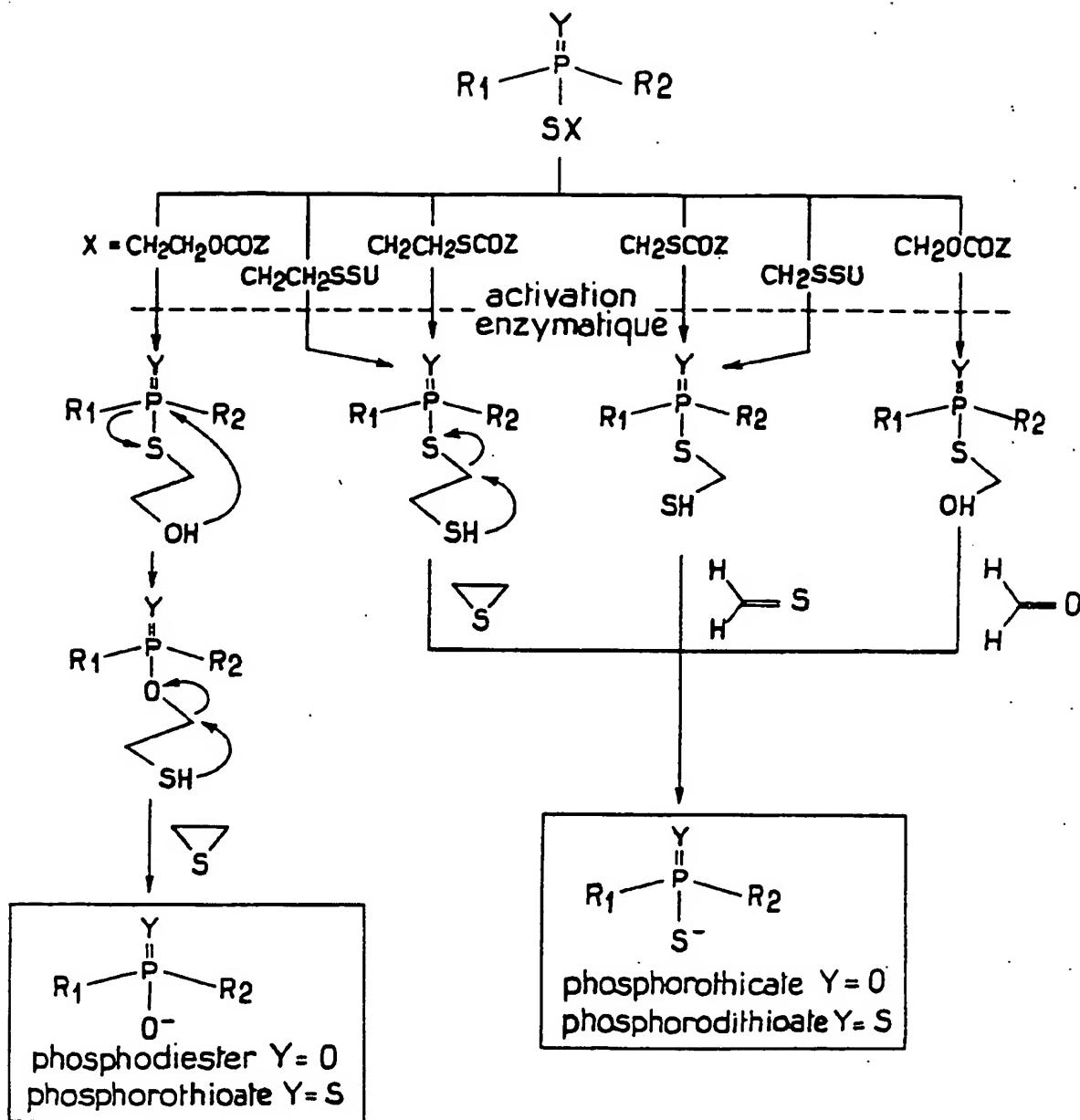
9. Oligonucléotide selon la revendication 8 caractérisé en ce que les enchainements internucléotidiques aux extrémités 5' et 3' respectivement de R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont du type méthyl-phosphonate.

10. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il est constitué d'un oligomère chimérique comportant une séquence centrale d'ADN ou d'ARN d'anomérie  $\beta$ , dont les enchainements internucléotidiques sont du type  $Y = P - SX$ , cette séquence centrale étant flanquée en 5' et 3' de séquences d'ADN ou d'ARN d'anomérie alpha.

11. Oligonucléotide selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il est constitué d'un oligomère chimérique contenant une séquence centrale d'encadrement de  $\beta$ -nucléosides phosphorothioates triesters à 10 enchainement internucléotidique de type  $Y = P - SX$  encadrée par des flancs constitués d'enchainements d'alpha nucléosides phosphates diesters.

12. Procédé de préparation d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'on effectue une réaction de substitution nucléophile par l'atome de soufre de la liaison  $-P-S-$  d'un oligonucléotide phosphorothiate diester sur un agent alkylant XL, conduisant ainsi à la formation d'enchainements internucléotidiques phosphorothiates triesters  $Y = P - SX$ , L étant un groupe partant tel 20 halogène, ester, tosyl, et X étant un groupement bioréversible tel que défini dans les revendications 1 à 11.

1 / 1

FIG. 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No  
PCT/FR 94/00563

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 463 712 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 2 January 1992 see page 6, line 16 - page 7, line 40 see page 8, line 9 - line 35 ---	1
X	US,A,5 210 264 (E.K.YAU) 11 May 1993 see the whole document ---	1
X	WO,A,91 04983 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 18 April 1991 see page 12, line 20 - line 28 ---	1
A	EP,A,0 519 463 (EUROPAISCHES LABORATORIUM FUR MOLEKULARBIOLOGIE) 23 December 1992 see claim 1 -----	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 August 1994	10.08.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer  Scott, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00563

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0463712	02-01-92	AU-A-	7105791	02-01-92
		CA-A-	2036287	28-12-91
		JP-A-	6009682	18-01-94
		US-A-	5278302	11-01-94
US-A-5210264	11-05-93	NONE		
WO-A-9104983	18-04-91	AU-A-	6603690	28-04-91
		US-A-	5218103	08-06-93
EP-A-0519463	23-12-92	DE-A-	4216134	24-12-92
		AU-A-	1824992	24-12-92
		CA-A-	2071446	21-12-92
		JP-A-	6128284	10-05-94

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande internationale No  
PCT/FR 94/00563

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
**CIB 5 C07H21/00**

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

**CIB 5 C07H**

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistées
X	EP,A,0 463 712 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 2 Janvier 1992 voir page 6, ligne 16 - page 7, ligne 40 voir page 8, ligne 9 - ligne 35 ---	1
X	US,A,5 210 264 (E.K.YAU) 11 Mai 1993 voir le document en entier ---	1
X	WO,A,91 04983 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 18 Avril 1991 voir page 12, ligne 20 - ligne 28 ---	1
A	EP,A,0 519 463 (EUROPAISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE) 23 Décembre 1992 voir revendication 1 -----	1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
3 Août 1994	10.08.94
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  Scott, J

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No  
**PCT/FR 94/00563**

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0463712	02-01-92	AU-A- 7105791 CA-A- 2036287 JP-A- 6009682 US-A- 5278302	02-01-92 28-12-91 18-01-94 11-01-94
US-A-5210264	11-05-93	AUCUN	
WO-A-9104983	18-04-91	AU-A- 6603690 US-A- 5218103	28-04-91 08-06-93
EP-A-0519463	23-12-92	DE-A- 4216134 AU-A- 1824992 CA-A- 2071446 JP-A- 6128284	24-12-92 24-12-92 21-12-92 10-05-94